

( Translation )

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

Date of Application: June 7, 2000

Application Number: Japanese Patent Application  
No. 171186/2000

Applicant(s): NIPPON SHOKUBAI CO., LTD.

April 20, 2001

Commissioner,  
Patent Office

Kozo Oikawa (seal)

Certificate No. 2001-3032778



日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日

Date of Application:

2000年 6月 7日

出願番号

Application Number:

特願2000-171186

出願人

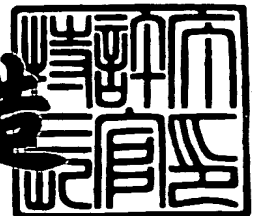
Applicant(s):

株式会社日本触媒

2001年 4月20日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2001-3032778

【書類名】 特許願

【整理番号】 P00-0255

【提出日】 平成12年 6月 7日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C07C 59/00

【発明の名称】 光学活性  $\alpha$ -ヒドロキシカルボン酸の製法

【請求項の数】 3

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台1丁目25番地12 株式会社  
日本触媒内

    【氏名】 奥田 典正

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台1丁目25番地12 株式会社  
日本触媒内

    【氏名】 仙波 尚

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台1丁目25番地12 株式会社  
日本触媒内

    【氏名】 ▲土▼▲橋▼ 幸生

【特許出願人】

    【識別番号】 000004628

    【氏名又は名称】 株式会社 日本触媒

【代理人】

    【識別番号】 100091096

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

    【識別番号】 100096183

    【弁理士】

【氏名又は名称】 石井 貞次

【選任した代理人】

【識別番号】 100101904

【弁理士】

【氏名又は名称】 島村 直己

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9406568

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 光学活性  $\alpha$ -ヒドロキシカルボン酸の製法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 アルコール系溶媒、エステル系溶媒、エーテル系溶媒及びカルボン酸系溶媒からなる群から選ばれる少なくとも 1 種の有機溶媒を含有する溶媒を用いてカルボニル化合物とシアン化水素とを反応させて光学活性シアノヒドリンを製造後、前記反応溶媒中の前記有機溶媒を除去した後、光学活性シアノヒドリンを単離することなく、加水分解反応を行うことを特徴とする光学活性  $\alpha$ -ヒドロキシカルボン酸の製造方法。

【請求項 2】 加水分解反応に供する反応混合物中の前記有機溶媒の含有率が 10 重量%未満である請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】 加水分解反応を、鉍酸を用いて行う請求項 1 又は 2 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、医薬中間体等として有用な光学活性  $\alpha$ -ヒドロキシカルボン酸を効率的に製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

従来、光学活性  $\alpha$ -ヒドロキシカルボン酸は、対応するカルボニル化合物に、アルコール系溶媒、エステル系溶媒、エーテル系溶媒、カルボン酸系溶媒、炭化水素系溶媒等の有機溶媒中、植物から抽出される (S)-ヒドロキシニトリルリアーゼ、(R)-ヒドロキシニトリルリアーゼ等の酵素、又はこれらの酵素の遺伝子を組み込んだ遺伝子組換え微生物によって生産される酵素の存在下にシアン化水素を不斉付加して光学活性シアノヒドリンを得た後、これを加水分解することにより製造されている（例えば、Synthesis, July 1990, 575-578; Tetrahedron Letters, 32, 2605-2608 (1991); 特開昭 63-219388 号; 特開平 5-317065 号; WO 98/30711）。

【 0 0 0 3 】

これらの方法では、光学活性シアノヒドリンを単離した後、加水分解するか、効率面を考慮して、光学活性シアノヒドリン製造工程で用いた反応溶媒を除去することなく、加水分解している。

【 0 0 0 4 】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、工業的に有利な光学活性 $\alpha$ -ヒドロキシカルボン酸の製造方法を提供することを目的する。

【 0 0 0 5 】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、光学活性 $\alpha$ -ヒドロキシカルボン酸の収率及び光学純度を向上させることを目的として、鋭意研究を重ねた結果、光学活性シアノヒドリン製造工程において反応溶媒としてアルコール系溶媒、エステル系溶媒、エーテル系溶媒又はカルボン酸系溶媒を用いた場合、当該溶媒を除去した後、加水分解することにより、このような除去をせずに加水分解した場合に比べて光学活性 $\alpha$ -ヒドロキシカルボン酸の収率及び光学純度がいずれも向上することを見出し、本発明を完成するに至った。

本発明は、以下の発明を包含する。

【 0 0 0 6 】

(1) アルコール系溶媒、エステル系溶媒、エーテル系溶媒及びカルボン酸系溶媒からなる群から選ばれる少なくとも1種の有機溶媒を含有する溶媒を用いてカルボニル化合物とシアン化水素とを反応させて光学活性シアノヒドリンを製造後、前記反応溶媒中の前記有機溶媒を除去した後、光学活性シアノヒドリンを単離することなく、加水分解反応を行うことを特徴とする光学活性 $\alpha$ -ヒドロキシカルボン酸の製造方法。

(2) 加水分解反応に供する反応混合物中の前記有機溶媒の含有率が10重量%未満である前記(1)に記載の方法。

(3) 加水分解反応を、鉍酸を用いて行う前記(1)又は(2)に記載の方法。

【 0 0 0 7 】

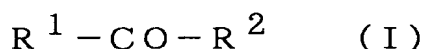
## 【発明の実施の形態】

本発明の方法は、光学活性シアノヒドリンの製造工程に用いたアルコール系溶媒、エステル系溶媒、エーテル系溶媒及び／又はカルボン酸系溶媒に起因する光学活性 $\alpha$ -ヒドロキシカルボン酸の収率及び光学純度の低下を防止するものであり、これらの溶媒を反応溶媒として用いるものであれば、光学活性シアノヒドリンの製造工程は特に制限はない。

## 【0008】

光学活性シアノヒドリンの製造工程としては、例えば、次式（I）：

## 【化1】



（式中、 $R^1$  及び  $R^2$  は、互いに異なり、それぞれ水素原子又は炭素数 22 以下の 1 価の炭化水素基を表し、前記炭化水素基中、 $-CH_2-$  並びに  $-CH_3$  の  $C$   $H_2$  はカルボニル基、スルホニル基、 $-O-$  又は  $-S-$  で置き換えられていてもよく、 $=CH_2$  は  $=O$  又は  $=S$  で置き換えられていてもよく、また  $-CH_2-$  の  $C-H$ 、 $-CH_3$  の  $C-H$ 、 $>CH-$  の  $C-H$ 、 $=CH-$  の  $C-H$  並びに  $=CH_2$  の  $C-H$  は、 $N$  又は  $C$ -ハロゲンで置き換えられていてもよく、また、 $R^1$  及び  $R^2$  は、共同して非対称の 2 価の基を表してもよい。）

で示されるカルボニル化合物に、前記の有機溶媒中、植物から抽出される（S）-ヒドロキシニトリルリアーゼ、（R）-ヒドロキシニトリルリアーゼ等の酵素、又はこれらの酵素の遺伝子を組み込んだ遺伝子組換え微生物によって生産される酵素の存在下にシアン化水素を不斉付加して光学活性シアノヒドリンを得る工程が挙げられる（例えば、Synthesis, July 1990, 575-578; Tetrahedron Letters, 32, 2605-2608 (1991); 特開昭 63-219388 号; 特開平 5-317065 号; 特開平 9-227488 号公報、WO 98/30711）。

## 【0009】

前記式（I）において、炭素数 22 以下の 1 価の炭化水素基とは、直鎖状又は分岐状の鎖式炭化水素基、側鎖のない又は側鎖のある単環式炭化水素基、側鎖のない又は側鎖のある多環式炭化水素基、側鎖のない又は側鎖のあるスピロ炭化水素基、側鎖のない又は側鎖のある環集合構造の炭化水素基、あるいは、前記の環

式炭化水素基が置換した鎖式炭化水素基のいずれをも含む。また、飽和な炭化水素基並びに不飽和な炭化水素基のいずれをも含むが、不飽和な炭化水素基において、 $C=C=C$ のアレン構造を含む基は除く。直鎖状又は分岐状の鎖式炭化水素基としては、例えば、飽和な鎖式炭化水素基である、炭素数 1 以上の直鎖状アルキル基、炭素数 3 以上の分岐状アルキル基、不飽和な鎖式炭化水素基である、炭素数 2 以上の直鎖状アルケニル基、炭素数 3 以上の分岐状アルケニル基、炭素数 3 以上の直鎖状アルキニル基、炭素数 4 以上の分岐状アルキニル基、炭素数 4 以上の直鎖状アルカジエニル基、炭素数 5 以上の分岐状アルカジエニル基などを例示することができる。単環式炭化水素基としては、例えば、飽和な単環式炭化水素基である、炭素数 3 以上の側鎖のないシクロアルキル基、総炭素数 4 以上の側鎖のあるシクロアルキル基、不飽和な単環式炭化水素基である、炭素数 4 以上の側鎖のないシクロアルケニル基、総炭素数 5 以上の側鎖のあるシクロアルキニル基、炭素数 5 以上の側鎖のないシクロアルカジエニル基、総炭素数 6 以上の側鎖のあるシクロアルカジエニル基などを例示することができる。不飽和な単環式又は多環式炭化水素基としては、芳香族炭化水素基、例えば、フェニル基、1-ナフチル基、2-ナフチル基、9-アントリル基など総炭素数 6～22 の側鎖のない芳香族基、総炭素数 7 以上の側鎖のある芳香族基、更には、環集合構造の炭化水素基でもある、炭素数 12 のフェニルフェニル基、総炭素数 13 以上の側鎖のあるフェニルフェニル基を例示することができる。また、多環式炭化水素基としては、炭素数 6 以上の側鎖のない縮合環式炭化水素基、総炭素数 7 以上の側鎖のある縮合環式炭化水素基、炭素数 7 以上の側鎖のない架橋環式炭化水素基、総炭素数 8 以上の側鎖のある架橋環式炭化水素基、総炭素数 9 以上の側鎖のないスピロ炭化水素基、総炭素数 10 以上の側鎖のあるスピロ炭化水素基などを例示することができる。なお、前記の側鎖のない縮合環式炭化水素基において、縮合する環の一つがベンゼン環である場合、その総炭素数が 9 以上となるものを挙げることができ、前記の側鎖のある縮合環式炭化水素基において、縮合する環の一つがベンゼン環である場合、その総炭素数が 10 以上となるものを挙げるができる。環集合構造の炭化水素基としては、総炭素数 6 以上の側鎖のないシクロアルキルシクロアルキル基、総炭素数 7 以上の側鎖のあるシクロアルキルシクロアル



キル基、総炭素数 6 以上の側鎖のないシクロアルキリデンシクロアルキル基、総炭素数 7 以上の側鎖のあるシクロアルキリデンシクロアルキル基などを例示することができる。なお、これらの環式炭化水素において、側鎖のあるとは、環上に鎖式炭化水素基が置換していることを意味する。前述する環式炭化水素基が置換した鎖式炭化水素基としては、総炭素数 7 以上の側鎖のない芳香族基で置換された直鎖状アルキル基、総炭素数 8 以上の側鎖のある芳香族基で置換された直鎖状アルキル基、総炭素数 9 以上の側鎖のない芳香族基で置換された分岐状アルキル基、総炭素数 10 以上の側鎖のある芳香族基で置換された分岐状アルキル基、総炭素数 8 以上の側鎖のない芳香族基で置換された直鎖状アルケニル基、総炭素数 9 以上の側鎖のある芳香族基で置換された直鎖状アルケニル基、総炭素数 9 以上の側鎖のない芳香族基で置換された分岐状アルケニル基、総炭素数 10 以上の側鎖のある芳香族基で置換された分岐状アルケニル基、総炭素数 8 以上の側鎖のない芳香族基で置換された直鎖状アルキニル基、総炭素数 9 以上の側鎖のある芳香族基で置換された直鎖状アルキニル基、総炭素数 10 以上の側鎖のない芳香族基で置換された分岐状アルキニル基、総炭素数 11 以上の側鎖のある芳香族基で置換された分岐状アルキニル基、総炭素数 10 以上の側鎖のない芳香族基で置換された直鎖状アルカジエニル基、総炭素数 11 以上の側鎖のある芳香族基で置換された直鎖状アルカジエニル基、総炭素数 11 以上の側鎖のない芳香族基で置換された分岐状アルカジエニル基、総炭素数 12 以上の側鎖のある芳香族基で置換された分岐状アルカジエニル基、総炭素数 4 以上の側鎖のないシクロアルキル基で置換された直鎖状アルキル基、総炭素数 5 以上の側鎖のあるシクロアルキル基で置換された直鎖状アルキル基、総炭素数 6 以上の側鎖のないシクロアルキル基で置換された分岐状アルキル基、総炭素数 7 以上の側鎖のあるシクロアルキル基で置換された分岐状アルキル基、総炭素数 5 以上の側鎖のないシクロアルキル基で置換された直鎖状アルケニル基、総炭素数 6 以上の側鎖のあるシクロアルキル基で置換された直鎖状アルケニル基、総炭素数 6 以上の側鎖のないシクロアルキル基で置換された分岐状アルケニル基、総炭素数 7 以上の側鎖のあるシクロアルキル基で置換された分岐状アルケニル基、総炭素数 5 以上の側鎖のないシクロアルキル基で置換された直鎖状アルキニル基、総炭素数 6 以上の側鎖のあるシクロア

ルキル基で置換された直鎖状アルキニル基、総炭素数 7 以上の側鎖のないシクロアルキル基で置換された分岐状アルキニル基、総炭素数 8 以上の側鎖のあるシクロアルキル基で置換された分岐状アルキニル基、総炭素数 8 以上の側鎖のないシクロアルキル基で置換された分岐状アルカジエニル基、総炭素数 9 以上の側鎖のあるシクロアルキル基で置換された分岐状アルカジエニル基などを例示することができる。

## 【 0 0 1 0 】

なお、以下においては、側鎖のない芳香族基、側鎖のある芳香族基、並びに、フェニルフェニル基又は側鎖のあるフェニルフェニル基などを併せて、アリール基といい、このアリール基で置換された直鎖状又は分岐状のアルキル基をアラルキル基という。他の環式炭化水素基に関しても、特に明記しない場合、環上に側鎖のないものとあるものを併せて指す場合には、単にシクロアルキル基等の名称を用いる。鎖式炭化水素基についても、直鎖状のものと分岐状のものを併せて指す場合には、単にアルキル基等の名称を用いる。

## 【 0 0 1 1 】

前記炭化水素基中、 $-\text{CH}_2-$ がカルボニル基、スルホニル基、 $-\text{O}-$ 又は $-\text{S}-$ で置き換えられると、それぞれケトン、スルホン、エーテル又はチオエーテルの構造が導入され、 $-\text{CH}_3$ の $-\text{CH}_2-$ がカルボニル基、 $-\text{O}-$ 又は $-\text{S}-$ で置き換わると、それぞれホルミル基（アルデヒド）、水酸基又はメルカプト基に変わり、あるいは、末端の $=\text{CH}_2$ が $=\text{O}$ 又は $=\text{S}$ に置き換わると、ケトン、チオケトンの構造が導入されることを意味し、また、 $-\text{CH}_2-$ の $\text{C}-\text{H}$ が $\text{N}$ に変わると、 $-\text{NH}-$ となり、 $>\text{CH}-$ の $\text{C}-\text{H}$ が $\text{N}$ に変わると、 $>\text{N}-$ となり、 $=\text{CH}-$ の $\text{C}-\text{H}$ が $\text{N}$ に変わると、 $=\text{N}-$ となり、末端の $-\text{CH}_3$ の $\text{C}-\text{H}$ が $\text{N}$ に変わると、 $-\text{NH}_2$ が導入され、 $=\text{CH}_2$ の $\text{C}-\text{H}$ が $\text{N}$ に変わると、 $=\text{NH}$ となる。また、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-$ 、 $=\text{CH}-$ 、 $\equiv\text{CH}$ 又は $>\text{CH}-$ の $\text{C}-\text{H}$ が $\text{C}-\text{ハロゲン}$ で置き換えられると、当該炭素上へハロゲン原子を置換することになる。なお、炭素鎖中における $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $\text{N}$ への置き換えは、当該炭化水素基に対する、それぞれオキサ置換、チア置換、アザ置換に当たり、例えば、炭化水素環の環の骨格炭素で起こると、炭化水素環のそれぞれ含酸素複素環、含硫

黄複素環、含窒素複素環への変換となる。該炭化水素基中、 $\text{CH}_2$ 並びに $\text{C-H}$ における置き換えは、それぞれ独立に行われてよく、加えて、前記の置き換えを行った後、なお当該炭素上に $\text{CH}_2$ 又は $\text{C-H}$ が残存する際には、更に置き換えがなされてもよい。更には、前記の置き換えにより、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ の $-\text{CO}-\text{O}-\text{H}$ ；カルボン酸構造への変換などもなされる。

## 【0012】

本明細書において、ハロゲン原子とは、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子を指すが、フッ素原子、塩素原子、臭素原子が好ましい。

従って、前記炭化水素基としては、鎖式炭化水素基並びに環式炭化水素基など環構造を有する炭化水素基のいずれをも選択でき、例えば、飽和鎖式炭化水素基である直鎖状又は分岐状のアルキル基、不飽和鎖式炭化水素基である直鎖状又は分岐状のアルケニル基、直鎖状又は分岐状のアルキニル基、直鎖状又は分岐状のアルカジエニル基など、飽和な環式炭化水素基であるシクロアルキル基、不飽和な環式炭化水素基であるシクロアルケニル基、シクロアルキニル基、シクロアルカジエニル基など、芳香族炭化水素基であるアリール基、アラルキル基、アリーラルケニル基などが挙げられる。

## 【0013】

更に詳しくいえば、直鎖状又は分岐状のアルキル基としては、例えばメチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、1-メチルプロピル基、ペンチル基、1-メチルブチル基、ヘキシル基、1-メチルペンチル基、ヘプチル基、1-メチルヘキシル基、1-エチルペンチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、2-メチルプロピル基、2-メチルブチル基、3-メチルブチル基、2-メチルペンチル基、3-メチルペンチル基、4-メチルペンチル基、メチルヘキシル基、メチルヘプチル基、メチルオクチル基、メチルノニル基、1, 1-ジメチルエチル基、1, 1-ジメチルプロピル基、2, 6-ジメチルヘプチル基、3, 7-ジメチルオクチル基、2-エチルヘキシル基など、シクロアルキルアルキル基としては、シクロペンチルメチル基、シクロヘキシルメチル基など、シクロアルキル基としては、シクロプロピル基、シクロブチル基、シクロペンチル基、メチルシクロ

ペンチル基、シクロヘキシル基、メチルシクロヘキシル基、シクロヘプチル基、シクロオクチル基など、ビスクロアルキル基としては、ノルボルニル基、ビスクロ[2. 2. 2]オクチル基、アダマンチル基などが挙げられる。直鎖状又は分岐状のアルケニル基としては、例えばビニル基、アリル基、クロチル基（2-ブテニル基）、イソプロペニル基（1-メチルビニル基）など、シクロアルケニル基又はシクロアルカジエニル基としては、シクロペンテニル基、シクロペンタジエニル基、シクロヘキセニル基、シクロヘキサンジエニル基などが挙げられる。直鎖状又は分岐状のアルキニル基としては、例えばエチニル基、プロピニル基、ブチニル基などが挙げられる。アリール基としては、例えばフェニル基、1-ナフチル基、2-ナフチル基、2-フェニルフェニル基、3-フェニルフェニル基、4-フェニルフェニル基、9-アントリル基、メチルフェニル基、ジメチルフェニル基、トリメチルフェニル基、エチルフェニル基、メチルエチルフェニル基、ジエチルフェニル基、プロピルフェニル基、ブチルフェニル基などが挙げられる。アラルキル基としては、例えばベンジル基、1-ナフチルメチル基、2-ナフチルメチル基、フェネチル基（2-フェニルエチル基）、1-フェニルエチル基、フェニルプロピル基、フェニルブチル基、フェニルペンチル基、フェニルヘキシル基、メチルベンジル基、メチルフェネチル基、ジメチルベンジル基、ジメチルフェネチル基、トリメチルベンジル基、エチルベンジル基、ジエチルベンジル基などが挙げられる。アリールアルケニル基としては、例えばスチリル基、メチルスチリル基、エチルスチリル基、ジメチルスチリル基、3-フェニル-2-プロペニル基などが挙げられる。

## 【 0 0 1 4 】

前記炭化水素基中の $\text{CH}_2$ がカルボニル基、スルホニル基、O又はSで、又はC-HがN又はC-ハロゲンで置き換えられた基としては、ケトン、アルデヒド、カルボン酸、スルホン、エーテル、チオエーテル、アミン、アルコール、チオール、ハロゲン、複素環（例えば、含酸素複素環、含硫黄複素環、含窒素複素環）などの構造を一つ以上含む基が挙げられる。なお、含酸素複素環、含硫黄複素環、含窒素複素環とは、環式炭化水素基の環骨格の炭素がそれぞれ酸素、硫黄、窒素で置き換わるものを意味し、更には、これらヘテロ原子置換が二種以上ある

複素環であってもよい。前記の置換を有する炭化水素基としては、例えば、ケトン構造のアセチルメチル基、アセチルフェニル基；スルホン構造のメタンスルホンメチル基；エーテル構造のメトキシメチル基、メトキシエチル基、エトキシエチル基、メトキシプロピル基、ブトキシエチル基、エトキシエトキシエチル基、メトキシフェニル基、ジメトキシフェニル基、フェノキシメチル基；チオエーテル構造のメチルチオメチル基、メチルチオフェニル基；アミン構造のアミノメチル基、2-アミノエチル基、2-アミノプロピル基、3-アミノプロピル基、2, 3-ジアミノプロピル基、2-アミノブチル基、3-アミノブチル基、4-アミノブチル基、2, 3-ジアミノブチル基、2, 4-ジアミノブチル基、3, 4-ジアミノブチル基、2, 3, 4-トリアミノブチル基、メチルアミノメチル基、ジメチルアミノメチル基、メチルアミノエチル基、プロピルアミノメチル基、シクロペンチルアミノメチル基、アミノフェニル基、ジアミノフェニル基、アミノメチルフェニル基；含酸素複素環のテトラヒドロフラニル基、テトラヒドロピラニル基、モルホリルエチル基；含酸素複素芳香環のフリル基、フルフリル基、ベンゾフリル基、ベンゾフルフリル基；含硫黄複素芳香環のチエニル基；含窒素複素芳香環のピロリル基、イミダゾリル基、オキサゾリル基、チアジアゾリル基、ピリジル基、ピリミジニル基、ピリダジニル基、ピラジニル基、テトラジニル基、キノリル基、イソキノリル基、ピリジルメチル基；アルコール構造の2-ヒドロキシエチル基、2-ヒドロキシプロピル基、3-ヒドロキシプロピル基、2, 3-ジヒドロキシプロピル基、2-ヒドロキシブチル基、3-ヒドロキシブチル基、4-ヒドロキシブチル基、2, 3-ジヒドロキシブチル基、2, 4-ジヒドロキシブチル基、3, 4-ジヒドロキシブチル基、2, 3, 4-トリヒドロキシブチル基、ヒドロキシフェニル基、ジヒドロキシフェニル基、ヒドロキシメチルフェニル基、ヒドロキシエチルフェニル基；チオール構造の2-メルカプトエチル基、2-メルカプトプロピル基、3-メルカプトプロピル基、2, 3-ジメルカプトプロピル基、2-メルカプトブチル基、3-メルカプトブチル基、4-メルカプトブチル基、メルカプトフェニル基；ハロゲン化炭化水素基である2-クロロエチル基、2-クロロプロピル基、3-クロロプロピル基、2-クロロブチル基、3-クロロブチル基、4-クロロブチル基、フルオロフェニル基、ク

ロロフェニル基、ブロモフェニル基、ジフルオロフェニル基、ジクロロフェニル基、ジブロモフェニル基、クロロフルオロフェニル基、トリフルオロフェニル基、トリクロロフェニル基、フルオロメチルフェニル基、トリフルオロメチルフェニル基；アミン構造とアルコール構造を有する 2-アミノ-3-ヒドロキシプロピル基、3-アミノ-2-ヒドロキシプロピル基、2-アミノ-3-ヒドロキシブチル基、3-アミノ-2-ヒドロキシブチル基、2-アミノ-4-ヒドロキシブチル基、4-アミノ-2-ヒドロキシブチル基、3-アミノ-4-ヒドロキシブチル基、4-アミノ-3-ヒドロキシブチル基、2, 4-ジアミノ-3-ヒドロキシブチル基、3-アミノ-2, 4-ジヒドロキシブチル基、2, 3-ジアミノ-4-ヒドロキシブチル基、4-アミノ-2, 3-ジヒドロキシブチル基、3, 4-ジアミノ-2-ヒドロキシブチル基、2-アミノ-3, 4-ジヒドロキシブチル基、アミノヒドロキシフェニル基；ハロゲンと水酸基で置換された炭化水素基であるフルオロヒドロキシフェニル基、クロロヒドロキシフェニル基；カルボン構造のカルボキシフェニル基などが挙げられる。

## 【 0 0 1 5 】

$R^1$  及び  $R^2$  で表される非対称の 2 価の基としては、特に制限はなく、例えば、ノルボルナン-2-イリデン、2-ノルボルナン-5-イリデンが挙げられる。

## 【 0 0 1 6 】

前記式 (I) で示されるカルボニル化合物としては、例えば、ベンズアルデヒド、*m*-フェノキシベンズアルデヒド、*p*-メチルベンズアルデヒド、*o*-クロロベンズアルデヒド、*m*-クロロベンズアルデヒド、*p*-クロロベンズアルデヒド、*m*-ニトロベンズアルデヒド、3, 4-メチレンジオキシベンズアルデヒド、2, 3-メチレンジオキシベンズアルデヒド、フェニルアセトアルデヒド、フルフラール等の芳香族アルデヒド；アセトアルデヒド、ブチルアルデヒド、イソブチルアルデヒド、バレルアルデヒド、シクロヘキサンアルデヒド等の脂肪族アルデヒド；エチルメチルケトン、ブチルメチルケトン、メチルプロピルケトン、イソプロピルメチルケトン、メチルペンチルケトン、メチル (2-メチルプロピル) ケトン、メチル (3-メチルブチル) ケトン等の飽和脂肪族ケトン；メチル

(2-プロペニル) ケトン、(3-ブテニル) メチルケトン等の不飽和脂肪族ケトン；(3-クロロプロピル) メチルケトン等のアルキル(ハロアルキル) ケトン；2-(アルコキシカルボニルアミノ)-3-シクロヘキシルプロピオンアルデヒド等の2-(保護アミノ) アルデヒド；3-メチルチオプロピオンアルデヒド等のアルキルチオ脂肪族アルデヒドが挙げられる。

【0017】

本発明方法における光学活性シアノヒドリン製造工程では、反応溶媒としてアルコール系溶媒、エステル系溶媒、エーテル系溶媒及びカルボン酸系溶媒からなる群から選ばれる少なくとも1種の有機溶媒を含有する溶媒を用いる。

【0018】

アルコール系溶媒としては、例えば、メタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、1-ブタノール、2-ブタノール、イソブタノール、t-ブタノール、ヘキサノール、n-アミルアルコール、シクロヘキサノール等の脂肪族アルコールの他、ベンジルアルコール等が挙げられる。

エステル系溶媒としては、例えば、ギ酸メチル、酢酸メチル、酢酸エチル、酢酸ブチル、プロピオン酸メチル等の脂肪族エステルが挙げられる。

【0019】

エーテル系溶媒としては、例えば、ジエチルエーテル、ジプロピルエーテル、ジイソプロピルエーテル、ジブチルエーテル、t-ブチルメチルエーテル、ジメトキシエタン、テトラヒドロフラン等の脂肪族エーテルが挙げられる。

カルボン酸系溶媒としては、例えば、酢酸等の脂肪族カルボン酸が挙げられる。

【0020】

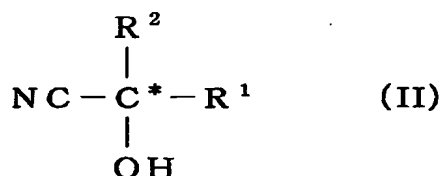
本発明に用いる反応溶媒は、前記の溶媒の他に、n-ペンタン、n-ヘキサン、シクロヘキサン、ベンゼン、トルエン、キシレン等の炭化水素系溶媒、pH7以下の水系緩衝液、例えばクエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、酢酸緩衝液等を含ってもよい。

【0021】

本発明方法における光学活性シアノヒドリン製造工程では、原料として、前記

式 (I) で示されるカルボニル化合物を用いた場合、当該化合物に対応する次式 (II) :

【化 2】



(式中、 $\text{R}^1$  及び  $\text{R}^2$  は、前記と同義であり、 $\text{C}^*$  は不斉炭素原子を表す。)

で示される光学活性シアノヒドリンが得られるが、本発明の方法においては、第 1 工程で得られた光学活性シアノヒドリンを単離することなく、第 2 工程の加水分解反応に用いる。

【0022】

本発明の方法においては、その際に、第 1 工程で反応溶媒として用いたアルコール系溶媒、エステル系溶媒、エーテル系溶媒及び／又はカルボン酸系溶媒を除去する。なお、これらの有機溶媒とともに、 $n$ -ペンタン、 $n$ -ヘキサン、シクロヘキサン、ベンゼン、トルエン、キシレン等の炭化水素系溶媒を併用した場合には、当該炭化水素系溶媒は除去しなくともよい。

前記の溶媒を除去する方法としては、例えば常圧又は減圧下で蒸発させる方法や水で抽出する方法等が挙げられるが、簡便で、かつ第 2 工程に与える影響が少ない点で減圧下で蒸発させる方法が好ましい。

【0023】

本発明における第 1 工程の反応溶媒の除去は、加水分解反応に供する反応混合物中のアルコール系溶媒、エステル系溶媒、エーテル系溶媒及びカルボン酸系溶媒の含有率が、10 重量%未満になるように行うことが好ましく、5 重量%未満になるように行うことが更に好ましい。

【0024】

本発明の方法における第 2 工程の加水分解反応を、鉱酸を用いて行うことが好ましい。ここで用いる鉱酸としては、例えば塩酸、硫酸、硝酸、ホウ酸、リン酸



、過塩素酸、好ましくは塩酸が挙げられる。

【0025】

鉍酸の使用量は、加水分解反応に供する反応混合物中に含有される光学活性シアノヒドリンに対して1～10当量であることが好ましい。鉍酸の使用量が、光学活性シアノヒドリンに対して10当量を超えると、経済的に不利で、かつ回収率が低下し、一方、光学活性シアノヒドリンに対して1当量未満であると、反応が遅く十分に進行しなくなったり、目的とする光学活性 $\alpha$ -ヒドロキシカルボン酸の光学純度が低下する。鉍酸の使用量は、光学活性シアノヒドリンに対して、2～8当量であることが更に好ましい。

【0026】

加水分解反応は、反応時の最高温度が40～90℃となるような条件下で行うことが好ましい。反応時の最高温度が90℃を超えると、副生成物や着色が増加し、一方、反応時の最高温度が40℃未満であると、反応が十分に進行せず、またいずれの場合も、目的とする光学活性 $\alpha$ -ヒドロキシカルボン酸の光学純度が低下する。反応時の最高温度は、40～80℃であることが更に好ましい。また、反応温度が40℃未満である反応時間は、15時間以下とすることが好ましく、3時間以下とすることが更に好ましい。

【0027】

加水分解反応において、反応溶媒は使用してもよいが特に効果がなく、また収率や光学純度を低下させることがあるので、水以外の溶媒は使用しないことが好ましい。また、反応開始時における反応混合物中の水の含量は、用いる鉍酸中に含有される分を含めて、光学活性シアノヒドリンに対して、7～50当量であることが好ましく、10～40当量であることが更に好ましい。

反応終了後、反応溶液（スラリーになっている場合もある。）から目的とする $\alpha$ -ヒドロキシカルボン酸を単離するためには、有機溶媒を用いて抽出し、必要に応じて水洗した後、溶媒を蒸発・乾固させればよい。

【0028】

以上のようにして、光学活性シアノヒドリンの立体配置を保ったまま、該光学活性シアノヒドリンのシアノ基をカルボキシル基に変換することにより、光学活

性 $\alpha$ -ヒドロキシカルボン酸を製造することができる。

【0029】

【実施例】

以下、本発明を実施例及び比較例により説明するが、本発明は、以下の実施例に限定されるものではない。

(調製例1) S-ヒドロキシニトリルリアーゼの調製

(S-ヒドロキシニトリルリアーゼの調製)

S-ヒドロキシニトリルリアーゼは、酵母サッカロマイセス・セレビシエを宿主として用い、遺伝子工学的に調製した。すなわち、まず、キャッサバの葉から常法に従って、全mRNAを抽出した。次いで、得られたmRNAを鋳型として、cDNA合成を行い、cDNAを作製した。一方、文献[Arch. Biochem. Biophys. 311, 496-502(1994)]に記載のキャッサバ由来のS-ヒドロキシニトリルリアーゼ遺伝子の配列に基づいて、下記のプライマーを合成した。

【0030】

センスプライマー：ggggaattcatggtaactgcacattttgttctgattc(配列番号1)

アンチセンスプライマー：ggggctcgacctcacggattagaagccgccg(配列番号2)

合成したプライマーを用い、上記cDNAを鋳型としてPCR(90℃、30秒；55℃、30秒；72℃、60秒；計35サイクル)を行い、S-ヒドロキシニトリルリアーゼ遺伝子を獲得した。遺伝子配列の解析を行ったところ、文献に示されている配列と一致した。

【0031】

次いで、得られたPCR断片を発現ベクターYEp352-GAPのプロモーターとターミネーターとの間に挿入することにより、酵母エピソード型発現ベクターYEp352-GCを作製した。これを酵母サッカロマイセス・セレビシエInv-Sc1株へ、常法によって形質転換し、ウラシルを含まない最少選択培地において増殖する株を選択することによって発現ベクターYEp352-GCを含む組換え酵母菌YEp352-GC-S2株を得た。

【0032】

次いで、得られた組換え酵母菌株YEp352-GC-S2株を、YNBDCas液体培地(6.7g/

L Yeast nitrogen base without amino acid(Difco社製)、20g/Lグルコース、20g/Lカザミノ酸、40mg/mL L-トリプトファン) 中で24時間培養することによって、細胞内にS-ヒドロキシニトリルリアーゼを生産させた。組換え菌培養液から遠心分離によって菌体を回収し、ビーズミルを用い、菌体を破碎した。破碎菌体液を遠心分離し、粗酵素液を調製、これを硫酸分画することによって粗精製したものをS-ヒドロキシニトリルリアーゼ溶液として、以下の実験に使用した。

## 【 0 0 3 3 】

## (S-ヒドロキシニトリルリアーゼの固定化)

前述のようにして調製したS-ヒドロキシニトリルリアーゼを、Micro Bead Silica Gel 300A (富士シリシア化学株式会社製) に固定化した。酵素の固定化は、S-ヒドロキシニトリルリアーゼ溶液 (活性: 64U/ml、0.02M HEPES-Na緩衝液(pH6.0)) 1.0Lに担体200gを加え、4℃で24時間攪拌することにより、酵素タンパク質を担体に吸着固定することにより行った。

## 【 0 0 3 4 】

## (第一工程: 固定化酵素を用いた光学活性シアノヒドリン合成反応)

## (実施例1)

容量2Lのフラスコに、固定化酵素200g、10mMリン酸緩衝液(pH5.5)で飽和したt-ブチルメチルエーテル(tBME)1.2L、ベンズアルデヒド127.2g(2.0mol)及び青酸49.2g(3.0mol)を仕込み、20℃で1時間攪拌した。反応終了後、HPLCを用いて反応液を分析して得られたシアノヒドリンの量及び光学純度を求めた。

## 【 0 0 3 5 】

## (実施例2)

溶媒としてtBMEの代わりに酢酸エチルを用いた以外は実施例1と同様にして反応を行った。

## 【 0 0 3 6 】

## (実施例3)

容量5Lのフラスコにベンズアルデヒド、青酸及び酢酸ナトリウムをそれぞれ0.1M、0.3M及び0.05Mの濃度で含有する25wt%メタノール水溶

液 5. 0 L 及び固定化酵素 5 0 g を仕込み、実施例 1 と同様にして反応を行った。

【 0 0 3 7 】

(参考例)

溶媒として t B M E の代わりにヘキサンを用いた以外は実施例 1 と同様にして反応を行った。

以上の反応の結果を表 1 に示す。

【 0 0 3 8 】

【表 1】

	溶 媒	転化率 %	光学純度 % e e
実施例 1	tBME	9 8	99.9以上
実施例 2	酢酸エチル	9 7	99.9以上
実施例 3	メタノール/水	9 6	99.8
参考例	ヘキサン	9 6	99.8

(第二工程：加水分解反応)

(実施例 1 A)

実施例 1 の反応液をろ過して固定化酵素を除いた後、パラトルエンスルホン酸一水和物 2. 3 g を加えて振り混ぜ、得られた反応液の 4 分の 1 (出発原料 0. 5 m o l 分に相当) を取り、エバポレータを用いて t B M E の含有量が 2 w t % になるまで濃縮してから還流冷却器をつけた 3 0 0 m L のフラスコに移した。これに 3 5 % 塩酸 1 5 6 g (H C l 1. 5 m o l) を加え、室温で 1 時間攪拌後、更に 7 0 ° C で 5 時間攪拌した。室温まで冷却して酢酸エチル 1 7 5 g を加え、分液漏斗中で振り混ぜた後、有機層を水層から分離した。水層を再び酢酸エチル 1 7 5 g で抽出し、得られた有機層を前に得た有機層と合わせた後、水 5 0 g で洗浄した。こうして得られた有機層を減圧下で乾固した後、トルエン 8 0 g で洗浄し乾燥させ、s - マンデル酸 7 1. 7 g を得た。マンデル酸としての純度 (R - 体を含めて) は H P L C で 9 8. 8 % であり、光学純度は 9 9. 0 % e e であった。

【 0 0 3 9 】

(実施例 1 B)

t BME の含有量を 5 w t % とした以外は実施例 1 A と同様にして反応を行った。

【 0 0 4 0 】

(実施例 2 A)

実施例 1 の反応液をろ過して固定化酵素を除いた後、得られた反応液の 4 分の 1 を用い、原料中の酢酸エチルの含有量を 3 w t % にし、実施例 1 A と同様にして反応を行った。

【 0 0 4 1 】

(実施例 2 B)

酢酸エチルの含有量を 5 w t % とした以外は実施例 2 A と同様にして反応を行った。

【 0 0 4 2 】

(実施例 3 A)

実施例 3 で得た反応液を用い、ろ過し、パラトルエンスルホン酸一水和物 0. 5 8 g を加えて振り混ぜ、得られた反応液の全量を濃縮してメタノールの含有量を 5 w t % とし、以下実施例 1 A と同様にして反応を行った。

【 0 0 4 3 】

(参考例)

第一工程の参考例で得た反応液をろ過して固定化酵素を除いた後、得られた反応液の 4 分の 1 を用い、原料中のヘキサンの含有量を 1 5 w t % にし、以下実施例 1 A と同様にして反応を行った。

【 0 0 4 4 】

(比較例 1 ~ 4)

加水分解反応の原料中に残存する溶媒の量を変えた以外は実施例と同様にして反応を行った。

加水分解反応の結果を表 2 に示す。

【 0 0 4 5 】

【表 2】

No.	溶 媒 含有率(wt%)	カルボン酸 収率(%)	光学純度 (%ee)
実施例1A	tBME(2)	95	99.0
実施例1B	tBME(5)	93	98.3
実施例2A	酢酸エチル(3)	94	98.8
実施例2B	酢酸エチル(8)	92	97.9
実施例3	メタノール(5)	95	97.1
参考例	ヘキサン(15)	96	98.5
比較例1	tBME(15)	86	89.0
比較例2A	酢酸エチル(12)	89	86.4
比較例2B	酢酸エチル(20)	85	84.0
比較例3	メタノール(15)	90	92.5

注：カルボン酸収率は、得られたカルボン酸(R体含む)のmol数を収量とHPLC純度から求め、これを第一工程で得られたシアノヒドリン(R体含む)のmol数を基にして計算。

【0046】

【発明の効果】

本発明によれば、光学活性 $\alpha$ -ヒドロキシカルボン酸を好収率かつ高純度で製造することができる。

【0047】

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; NIPPON SHOKUBAI CO., LTD.

<120> The process of synthesis of optical active  $\alpha$ -hydroxycarboxylic acid

&lt;130&gt; P00-0255

<160> 2

<210> 1

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 1

ggggaattca tggtaactgc acattttggtt ctgattc

37

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 2

ggggtcgacc tcacggatta gaagccgccg

30

【 0 0 4 8 】

【配列表のフリーテキスト】

配列番号 1 : 合成DNA

配列番号 2 : 合成DNA

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 工業的に有利な光学活性 $\alpha$ -ヒドロキシカルボン酸の製造方法を提供する。

【解決手段】 アルコール系溶媒、エステル系溶媒、エーテル系溶媒及びカルボン酸系溶媒からなる群から選ばれる少なくとも1種の有機溶媒を含有する溶媒を用いてカルボニル化合物とシアン化水素とを反応させて光学活性シアノヒドリンを製造後、前記反応溶媒中の前記有機溶媒を除去した後、光学活性シアノヒドリンを単離することなく、加水分解反応を行うことを特徴とする光学活性 $\alpha$ -ヒドロキシカルボン酸の製造方法。

【選択図】 なし



出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000004628]

1. 変更年月日 1991年 6月11日  
[変更理由] 名称変更  
住 所 大阪府大阪市中央区高麗橋4丁目1番1号  
氏 名 株式会社日本触媒
2. 変更年月日 2000年12月 6日  
[変更理由] 住所変更  
住 所 大阪府大阪市中央区高麗橋4丁目1番1号  
氏 名 株式会社日本触媒